

· 论 著 ·

热疗对肺癌 A549 细胞 P-糖蛋白表达影响的实验研究

卞春安, 严煜, 王晓谭, 张裕东

(江苏省南通市南通大学附属医院胸心外科 226001)

摘要:目的 研究不同温度、不同加热时间下热疗对肺癌 A549 细胞 P-糖蛋白(P-gp)表达的影响,为肺癌的热疗和热化疗提供理论依据。方法 体外复苏与培养肺癌 A549 细胞;对照组 37 °C 下培养,实验组按不同时间、不同温度分组水浴加热肺癌 A549 细胞后培养 24 h,采用流式细胞术(FCM)观察热处理后的肺癌 A549 细胞株 P-gp 表达的变化。结果 流式细胞术显示各热疗组 A549 细胞的 P-gp 的表达率均较对照组下降,且 P-gp 的表达率与加热的的时间和温度均呈负相关。结论 热疗可以抑制 P-gp 的表达,可能是逆转肿瘤细胞多药耐药的一种手段。

关键词:热疗;肺癌;P-糖蛋白

中图分类号:R734.1

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)06-0661-02

Influence of hyperthermia on expression of P-gp in lung cancer A549 cell

BIAN Chun-an, YAN Yu, WANG Xiao-tan, et al.

(Department of Cardiothoracic Surgery, Affiliated Hospital, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of hyperthermia on the expression of P-glycoprotein (P-gp) in lung cancer A549 cell by different temperature and heating time for providing the academic evidence in hyperthermia and thermochemotherapy for lung cancer. **Methods** To resuscitate and culture the A549 cells in vitro. Control group: A549 cells were cultivated at 37 °C. Experimental group: A549 cells were cultivated for 24 h after heated by different temperature and heating time. The flow cytometry (FCM) was adopted to observe the influence on the P-gp expression of A549 cell treated by hyperthermia. **Results** The FCM showed hyperthermia could cause reduction of P-gp expression in A549 cell and the expression of P-gp is negative correlation with the heating temperature and heating time. **Conclusion** Hyperthermia could cause reduction of P-gp expression in A549 cell. The results suggest that hyperthermia could be used as a method to overcome multidrug resistance.

Key words: hyperthermia; lung cancer; P-glycoprotein

目前化疗是治疗恶性肿瘤的主要手段之一,然而肿瘤细胞对化疗药物产生的多药耐药性(multidrug resistance, MDR)往往导致化疗的失败^[1]。近年来公认 MDR 的机制源于一种在许多耐药细胞的细胞膜上都有高表达的多药转运蛋白,即 P-糖蛋白(P-gp)^[2-3]。它具有作为运输者的特性:包括多次跨膜区域和一个 ATP 结合位点,可将化疗药物泵出细胞膜外。

热疗作为肿瘤治疗的一种新方法,可以逆转肿瘤耐药,提高化疗疗效,临床上已经有所证实。但热疗逆转肿瘤细胞多药耐药性的机制尚不明了,结论不一^[4]。本实验选用中高度表达 P-gp 的肺癌 A549 细胞作为实验对象,对其进行不同温度、不同时间的水浴加热,通过流式细胞术(FCM)观察不同条件下热疗对肺癌 A549 细胞株 P-gp 表达的影响,旨在通过实验初步了解热疗对肺癌 A549 热疗逆转肿瘤多药耐药性的可能机制,为肿瘤热疗以及热化疗提供一定的理论依据。

1 材料与方

1.1 材料 人肺癌 A549 细胞系由上海同济大学生命科学院提供;DMEM 培养液和胎牛血清为 Gibco/BRL 公司产品;CO₂ 培养箱 BB5060 为 Heraeus 公司产品;DK-8D 型电热恒温水浴箱为上海精宏实验设备公司制造;Anti-P-glycoprotein(PE 标记)购自美国 BD 公司;FACSCalibur 流式细胞仪为美国 BD 公司制造。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将细胞接种于 100 mL 培养瓶中,在内含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中常规培养(37 °C, 5%CO₂,

饱和湿度),取对数生长期的细胞进行加热处理。

1.2.2 加热实验 取对数生长期的 A549 细胞,用 0.25%的胰蛋白酶消化, PBS 洗 2 次,配成单细胞悬液调整浓度为 1×10⁵/mL,接种 6 孔板,每孔 3 mL,每组设 3 个复孔。对照组 37 °C 常规培养,不予加热处理。实验组加热温度分别设为 38、40 °C 和 42 °C,加热时间分别为 1、2、4 h。根据加热温度和加热时间的不同组合分为 9 个组,分别是:(1)38 °C 1 h 组;(2)38 °C 2 h 组;(3)38 °C 4 h 组;(4)40 °C 1 h 组;(5)40 °C 2 h 组;(6)40 °C 4 h 组;(7)42 °C 1 h 组;(8)42 °C 2 h 组;(9)42 °C 4 h 组;按分组分别进行水浴加热;将热处理后的细胞换新鲜的 10% FBS-DMEM 的培养液,并放回培养箱 37 °C 继续培养 24 h 后收集细胞。

1.2.3 流式细胞仪检测 P-gp 的表达 收集热处理后继续培养 24 h 的 A549 细胞,用 DMEM 完全培养液调节细胞浓度为 1×10⁶/mL,同时设阴性对照管(未染 PE),用 PBS 洗涤 3 次,每管加 50 μL PBS,给测定管中加 20 μL 抗 P-gp-PE,室温避光孵育 20 min。孵育后每管加 1 mL PBS 离心洗涤 1 次,测定管中加 300 μL PBS,阴性对照管中加 500 μL PBS 重悬沉淀,上流式细胞仪检测。应用 Cell Quest 软件获取数据并分析成像。

1.3 统计学方法 用 Stata7.0 统计软件进行数据统计处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 *t* 检验、方差分析比较两组和多组间的数据, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

将待测 A549 细胞标本用 Anti-P-glycoprotein-PE 荧光染

色后,运用 FACSCalibur 型流式细胞仪对不同加热时间、不同加热温度处理后的 A549 细胞进行 P-gp 表达的测定,根据荧光检测结果得出各组 A549 细胞的 P-gp 表达率。本实验发现 A549 细胞 P-gp 的表达率与加热的的时间和温度均呈负相关,加热对肺癌 A549 细胞 P-gp 的表达有抑制作用。其结果见表 1、图 1。

表 1 P-gp 的表达率($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

温度	1 h	2 h	4 h
37 °C	85.45±0.486	—	—
38 °C	81.33±1.126*	77.46±2.220*	72.75 ±0.633*
40 °C	73.51±2.304*	61.07±1.074*	60.67±0.443*
42 °C	61.19±0.741*	58.37±0.930*	31.29±1.075*

*:与 37 °C 对照组比较, $P < 0.05$; —:表示此项无数据。

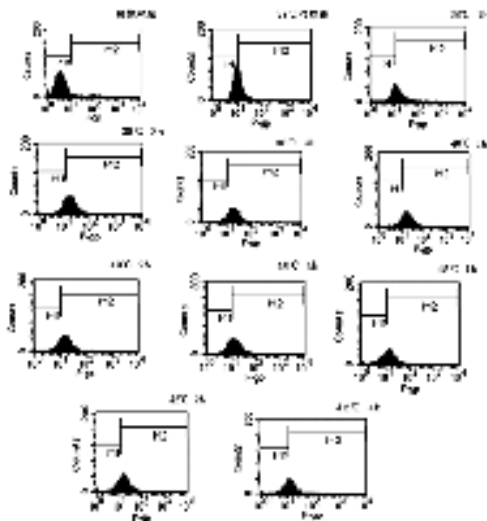


图 1 A549 细胞 P-gp 的表达直方图

3 讨论

化疗在临床上由于多药耐药现象的作用,有时效果不尽满意。现已发现了多种逆转 MDR 的方法,但因不良反应大,针对性太强而难以普遍使用。近年来热疗已成为人们关注逆转 MDR 的热点之一^[5]。不同的组织对热疗的反应不同,对 MDR 的影响亦难预测,从而影响对临床远期治疗手段的正确选择。目前研究表明,肿瘤细胞 MDR1 基因的表达产物 P-gp 的过度表达是导致肿瘤细胞多药耐药的重要原因。本实验对 A549 细胞采用水浴加热的方法,通过 FCM 检测 P-gp 表达的变化,实验表明,与对照组相比,A549 表达的 P-gp 随着加热时间的延长和加热温度的升高而逐渐下降。其机制可能为热疗抑制了 MDR1 基因的表达或是在对肿瘤细胞膜造成损伤的同时,影响了跨膜糖蛋白 P-gp 的表达。针对热疗对肿瘤细胞多药耐药的影响,有许多不同的观点:(1)认为热疗不仅提升了化疗药物在细胞内的浓度,而且逆转了 MDR。有文献研究提示,热疗可以逆转 K562/ADM 的 P-gp 和多药耐药相关蛋白(MRP)

的表达,增强了化疗药物在肿瘤细胞的浓度^[6-7]。(2)认为热疗提升了化疗药物在细胞内的浓度,但对 MDR 相关因子的表达无影响。同时认为化疗药物在细胞内浓度上升是由于热疗的作用改变了药物的药化动力学所致。(3)认为热疗可使化疗药物在细胞内中聚上升,同时使 MDR 因子的表达上升,形成 MDR。观察发现,热疗使转录因子 YB-1 转入细胞核内与 MDR1 和 MRP1 基因的启动子结合致使其表达上调^[8]。也有研究认为,在 MDR1 的启动子中有热休克因子(HSF1)的顺式作用元件,因此加热可使 MDR1 的表达加强,引起耐药^[9]。

综上所述,热疗对 MDR 细胞的作用可能与不同的病理组织类型和分化有关,因此有针对性地研究相关肿瘤细胞显得必要。热疗可能是逆转肿瘤细胞耐药提高化疗效果的一种有效手段,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Takara K, Sakaeda T, Okamura K. An update on overcoming MDR1-mediated multidrug resistance in cancer chemotherapy[J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12(3): 273.
- [2] Marzolini C, Paus E, Bucin T, et al. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2004, 75(1): 13.
- [3] 王治伟, 杨强, 赵渝. 肿瘤多药耐药的生化及分子机制[J]. *重庆医学*, 2008, 37(5): 543.
- [4] 徐建业, 周琦, 卢萍, 等. 加温诱导肿瘤细胞凋亡与逆转多药耐药性的实验研究[J]. *中华理疗杂志*, 2002, 23(1): 33.
- [5] Liu Y, Lillehei K, Cobb WN, et al. Overcoming MDR by ultrasound-induced hyperthermia and P-glycoprotein modulation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289(1): 62.
- [6] 张萍, 王大章, 郑光勇, 等. 热疗对肿瘤细胞耐药性的影响[J]. *华西口腔医学*, 2003, 21(2): 127.
- [7] 廖小莉, 胡晓桦, 谢伟敏, 等. 微波热疗对人乳腺癌阿霉素细胞 MCF-7 多药耐药蛋白及耐药性的影响[J]. *广西医学*, 2008, 30(8): 1126.
- [8] Stein U, Jurchott K, Walther W, et al. Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(30): 28562.
- [9] Vilaboa NE, Galan A, Troyano A, et al. Regulation of multidrug resistance 1 (MDR1)/P-glycoprotein gene expression and activity by heat-shock transcription factor 1 (HSF1)[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(32): 24970.

(收稿日期:2009-07-17 修回日期:2009-09-11)

启事:本刊对院士及 863、973 项目文章开通绿色通道,欢迎投稿。